

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**CARRERA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA MEDIANTE LA  
PRUEBA DE ELISA INDIRECTO EN VACAS LECHERAS DEL CANTÓN MEJÍA  
REGISTRADAS EN LA ASOCIACIÓN HOLSTEIN FRIESIAN DEL ECUADOR**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO  
O TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**DORIS AMANDA OÑA CODENA**  
**MAYRA ALEJANDRA CAJILEMA VINUEZA**

**DR JORGE MOSQUERA**

**Quito, mayo, 2012**

## DEDICATORIA

A Dios quien es y será la fuente de toda sabiduría y triunfo, y a mi familia, quienes han sido un apoyo en cada nuevo pasó en mi vida, a mi madre Luz Codena que nunca permitió que un tropiezo sea una caída, a mi padre Rodrigo Oña y Hno. Paul Oña los cuales han sabido ser pacientes en todo momento.

Doris Amanda Oña Codena

A Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Pilar por sus consejos, el amor que siempre me ha brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad.

A mi padre Jaime por la perseverancia y constancia que lo caracterizan, que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanos Santiago, Jaime y Ana Lucia por ser mis ejemplos a seguir, por su apoyo, confianza y amor.

Mayra Alejandra Cajilema Vinueza

## AGRADECIMIENTO

A Dios gracias padre mío porque sé que todo triunfo proviene de tus manos, a mi familia por el apoyo incondicional, a mi madre Luz Codena, padre Rodrigo Oña, Hno. Paul Oña, mis tíos Aní y Jaime, por su dedicación porque sé que sin su ayuda nada de este sueño sería posible, a ustedes que fueron un pilar en mi vida gracias por tu apoyo incondicional, a mi Director de tesis el Dr. Jorge Mosquera quien nos ha sabido guiar con sus conocimientos, al Dr. Julio paredes por su apoyo y esfuerzo que puso en la realización de esta tesis, a la Asociación Holstein Friesian por brindarnos sus instalaciones y por ultimo a la Dra. Zimerman representante de IDEXX Latinoamérica. A todos ellos mis sinceros agradecimientos.

Doris Amanda Oña Codena

A mis profesores quienes me han forjado como una profesional en esta etapa universitaria.

Un agradecimiento especial a mi director Dr. Jorge Mosquera por hacer posible esta tesis.

Al Dr. Julio Paredes por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo.

A mis amigos que me acompañaron en esta trayectoria de aprendizaje y conocimientos.

Mayra Alejandra Cajilema Vinueza

## AUTORIZACION DE LA AUTORIA INTELECTUAL

Nosotros, Doris Amanda Oña Codena y Mayra Alejandra Cajilema Vinueza en calidad de autores del trabajo de investigación o tesis realizada sobre “DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO EN VACAS LECHERAS DEL CANTÓN MEJÍA REGISTRADAS EN LA ASOCIACIÓN HOLSTEIN FRIESIAN DEL ECUADOR”, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que nos pertenecen de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autores nos corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a nuestro favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.

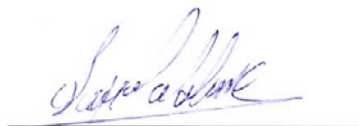
Quito, a 05 de Septiembre del 2012



Doris Amanda Oña Codena

C.I #: 171467311-6

[dona\\_amada06@yahoo.es](mailto:dona_amada06@yahoo.es)



Mayra Alejandra Cajilema Vinueza

C.I #: 171759294-1

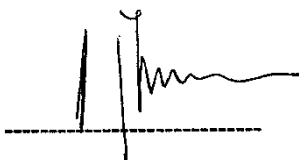
[mayralejita03@hotmail.com](mailto:mayralejita03@hotmail.com)

**HOJA DE APROBACION DEL TUTOR O DIRECTOR DE TESIS**

En mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado, presentado por la señorita Doris Amanda Oña Codena y la señorita Mayra Alejandra Cajilema Vinuesa, para optar el Título de Médico Veterinario Zootecnista cuyo Título es de DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO EN VACAS LECHERAS DEL CANTÓN MEJÍA REGISTRADAS EN LA ASOCIACIÓN HOLSTEIN FRIESIAN DEL ECUADOR.

Considero que dicho Trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Quito a los 05 días del mes de septiembre del 2012.

A handwritten signature in black ink, consisting of several vertical strokes followed by a wavy line, positioned above a horizontal dashed line.

Firma

Dr. Jorge Mosquera

C.C. 170260919-7.

## APROBACIÓN DEL TRABAJO/TRIBUNAL

**“DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO EN VACAS LECHERAS DEL CANTÓN MEJÍA REGISTRADAS EN LA ASOCIACIÓN HOLSTEIN FRIESIAN DEL ECUADOR”**

El tribunal constituido por:

Dr. Clímaco Egas como Presidente; Dr. Bolívar Ricaurte Vocal Principal; Dr. Edison Encalada Vocal Principal; Dr. Richard Rodríguez Biometrista, Dr. Gustavo Salgado Vocal Suplente; Luego de receptar la presentación del trabajo de grado previo a la obtención el título o grado de Médico Veterinario y Zootecnista, presentado por la señorita Doris Amanda Oña Codena y la señorita Mayra Alejandra Cajilema Vinueza.

Con el título:

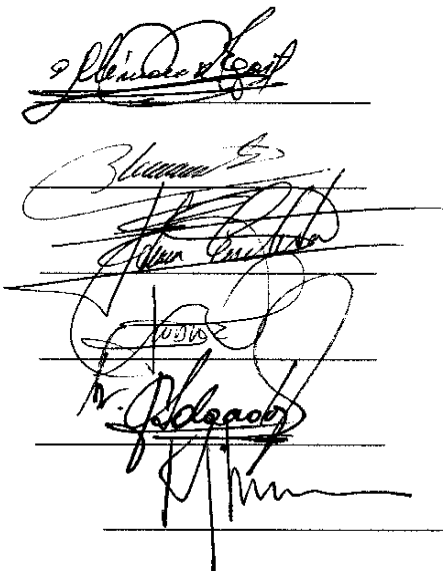
**“DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO EN VACAS LECHERAS DEL CANTÓN MEJÍA REGISTRADAS EN LA ASOCIACIÓN HOLSTEIN FRIESIAN DEL ECUADOR”**

Ha emitido el siguiente veredicto: APROBADO LA PRESENTE TESIS CON LA NOTA DE 10/10.

Quito, D.M. 30 de Mayo del 2012

Para constancia de lo actuado

Dr. Clímaco Egas	<b>Presidente</b>
Dr. Bolívar Ricaurte	<b>Vocal Principal</b>
Dr. Edison Encalada	<b>Vocal Principal</b>
Dr. Richard Rodríguez	<b>Biometrista</b>
Dr. Gustavo Salgado	<b>Vocal Suplente</b>
Dr. Jorge Mosquera	<b>Director de Tesis</b>



Handwritten signatures of the tribunal members over horizontal lines.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

## INDICE

<b>CAPITULO I</b>	<b>Pág.</b>
INTRODUCCION.....	1
<b>CAPITULO II</b>	
REVISION DE LITERATURA	
Epidemiologia	
Difusión.....	4
Infección.....	7
Factores Predisponentes.....	8
Etiología.....	9
Resistencia y Persistencia.....	10
Importancia Económica.....	11
Prevalencia Internacional.....	12
Diagnostico Prueba Elisa Indirecto.....	13
<b>CAPITULO III</b>	
MATERIALES Y METODOS.....	14
Materiales.....	15
Equipos y Materiales de Laboratorio.....	16
Método	

Método de Selección.....	20
Prueba Elisa Indirecto.....	21
<b>CAPITULO IV</b>	
RESULTADOS Y DISCUCIONES.....	24
<b>CAPITULO V</b>	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
Recomendaciones.....	30
<b>CAPITULO VI</b>	
BIBLIOGRAFIA.....	31
<b>CAPITULO VII</b>	
ABREVIACIONES.....	36
<b>CAPITULO IX</b>	
ANEXO A.....	38
ANEXO B.....	39
ANEXO C.....	40
ANEXO D.....	41
ANEXO E.....	42
ANEXO F.....	43
ANEXO G.....	44



**LISTA DE CUADROS**

	<b>Pág.</b>
CUADRO N°1.- Características climáticas del Cantón Mejía.	14
CUADRO N°2.- Clasificación Ecológica del Cantón Mejía	15
CUADRO N°3.- Nombre de las ganaderías, ubicación y número de sueros Bovinos utilizados en la prueba Elisa Indirecto.	17
CUADRO N°4.- Total de sueros bovinos, según las edades, utilizados en la Prueba Elisa Indirecto.	19
CUADRO N°5.- Resultados de la prueba Elisa Indirecto.	24
CUADRO N°6.- Resultados de la prueba Elisa Indirecto, según Parroquias Del Cantón Mejía.	25
CUADRO N°7.- Resultados de la prueba Elisa Indirecto según edad de Vacas en el Cantón Mejía.	27

**LISTA DE GRAFICOS**

	<b>Pág.</b>
GRAFICO N°1.- Número de sueros bovinos, por parroquia, para la prueba Elisa Indirecto en el Cantón Mejía.	18
GRAFICO N°2.- Porcentaje de sueros bovinos, por parroquia, para la prueba Elisa Indirecto en el Cantón Mejía.	18
GRAFICO N°3.- Porcentaje de sueros bovinos, según edad, para la prueba Elisa Indirecto en el Cantón Mejía.	19
GRAFICO N°4.- Correlación de los resultados obtenidos en la prueba Elisa Indirecto.	28

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**CARRERA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA MEDIANTE LA PRUEBA  
DE ELISA INDIRECTO EN VACAS LECHERAS DEL CANTÓN MEJÍA REGISTRADAS EN LA  
ASOCIACIÓN HOLSTEIN FRIESIAN DEL ECUADOR**

**RESUMEN**

La Paratuberculosis Bovina (PTBC) o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa crónica, caracterizada por pérdida progresiva de peso, diarrea crónica lo que produce muerte del animal. El presente estudio tuvo como objetivo evidenciar la presencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), en vacas lecheras del cantón Mejía. Se evaluaron 384 sueros sanguíneos seleccionados al azar en un banco de sueros, se diagnostico mediante la prueba ELISA Indirecto. Resultaron positivos 28 muestras (7.2%) y 5 sueros sospechosos (1.35%). Se encontró una correlación lineal positiva pero débil, la edad de los animales está relacionada con la presencia de animales positivos. Los resultados permitieron evidenciar la presencia de Map en un alto porcentaje en los sueros de los hatos bovinos muestreados del Cantón Mejía, Ecuador.

**Palabras claves:** Paratuberculosis / Diarrea / ELISA / Mejía / Bovinos

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BOVINE PARATUBERCULOSIS BY INDIRECT  
ELISA TEST IN DAIRY COWS OF THE CANTON MEJIA REGISTERED IN THE  
HOLSTEIN FRIESIAN ASSOCIATION OF ECUADOR

**ABSTRACT**

Bovine Paratuberculosis (PTBC) or Johne's disease is a chronic infectious disease, characterized by progressive loss of weight, chronic diarrhea which causes death of the animal. The objective of this study was to show the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map), in dairy cows from the Mejia canton. We evaluated 384 sera blood randomly selected from a bank of sera to diagnose through applying indirect ELISA test. The results showed 28 (7.2 %) positive samples and 5 suspects (1.35 %). We found a weak positive linear correlation, the age of the animals is related to the presence of positive animals. The results revealed the presence of Map in a high percentage in the serum of the cattle herds sampled the Canton Mejia, Ecuador.

**Key Words:** Paratuberculosis / Diarrhea / ELISA / Mejia / Cattle

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCION**

La Paratuberculosis Bovina (PTBC) o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa crónica que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, cuya característica principal es la pérdida progresiva de peso y la presencia de diarrea crónica, que produce desmejoramiento y finalmente la muerte del animal (20).

La paratuberculosis se conoce desde 1895 cuando Johne y Frothingham describieron por primera vez esta entidad clínica que afecta a la industria del ganado de carne y leche. La fauna salvaje libre o en cautiverio tampoco se encuentra a salvo de la enfermedad (20) (35).

La PTBC es distribución mundial que afecta principalmente a bovinos, ovinos y cabras con altos niveles de prevalencia causando un fuerte impacto económico, además de ser importante en Salud Pública por ser una enfermedad de tipo zoonótico (3).

Tiene implicancia sobre la productividad de los bovinos porque reduce la producción de leche y la ganancia de peso en los terneros, provoca la muerte de los animales infectados, conduce a la venta selectiva prematura e incrementa los costos veterinarios. La enfermedad se disemina entre los bovinos de un establecimiento mediante la eliminación del microorganismo por materia fecal y también puede ser introducida al hato mediante la compra de animales infectados (13).

De los costos totales dos tercios son soportados por la industria lechera, a pesar de que proporcionalmente es mucho más pequeña que la de la carne (46). Además la paratuberculosis tiene impacto en la salud pública porque el agente etiológico posee resistencia térmica y se menciona como una de las causas de la enfermedad de Crohn en el hombre (8) (14).

A pesar que la paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad que se reconoce desde hace más de un siglo y no había demostrado una presencia preponderante en las explotaciones de rumiantes, ha incrementado su importancia en los últimos años. Las dificultades en su diagnóstico han limitado un conocimiento de su distribución geográfica y hoy en día existe en el Ecuador un creciente interés de Médicos Veterinarios y productores de ganadería en conocer más sobre la presencia de la enfermedad y poner en práctica alternativas para su control (45).

La epidemiología está ligada a las características biológicas del microorganismo: lento desarrollo, parasitismo obligado, alta resistencia ambiental, posibilidad de infección congénita y transmisión a través de la leche. La PTBC presenta el mismo patrón epidémico que otras enfermedades infecciosas, la diferencia radica en el curso de ésta, por ello es necesario medir la tasa de prevalencia en el hato durante un período de varios años. Es por esta razón que no se observan epidemias (46).

En la actualidad, la PTBC se considera una enfermedad emergente a pesar de su reconocimiento desde hace más de un siglo (1895). En Europa varía de 7% a 55%, en EEUU la prevalencia está en el orden del 40% y en Australia se reportan tasas de infección de 9% a 22% (44). En el Ecuador, se desconoce la prevalencia de esta enfermedad. En virtud del carácter subclínico y por no existir estudios diagnósticos, la enfermedad está subestimada en nuestro país.

La presente investigación tiene como objetivo determinar la existencia o no de la enfermedad en el valle ganadero de Machachi e informar sobre diferentes aspectos de la enfermedad y las pérdidas económicas que ocasiona así como recomendar medidas de

manejo necesarias para controlarla. La paratuberculosis está presente en la mayoría de los hatos y plantea dificultades en las estrategias de control a implementar porque presenta un período de incubación muy largo y la infección es subclínica en la mayoría de los animales. Esta característica de la enfermedad hace que se registren muchos menos casos de los que en realidad se presentan, enmascarando el impacto sobre la productividad y el bienestar de los animales.

Por lo anteriormente citado y por no existir trabajos similares en el País, esta será la primera investigación que nos permitirá determinar la presencia o no de esta patología en las vacas de producción lechera del Cantón Mejía.

## **CAPITULO II**

### **REVISION DE LITERATURA**

#### **Epidemiología**

##### **Difusión**

La paratuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, que afecta tanto a rumiantes domésticos como a silvestres (7).

Esta enfermedad se presenta en todo el mundo, sobre todo en vacas, aunque puede afectar a todo tipo de rumiantes. La incidencia de la enfermedad clínica en un hato afectado es baja y rara vez excede el 5%. La mortalidad es inferior al 1% anual, pudiendo alcanzar hasta el 5 ó 10% en casos excepcionales. Las pérdidas económicas pueden ser significativas, si no por la muerte del animal, sí por los largos períodos de baja reproductividad, productividad y mal estado de salud (18).

Por cada caso que se observa de esta enfermedad se estima que existen 15 a 25 animales más infectados en el hato con presencia de la enfermedad clínica, subclínica o como portadores y 10 a 14 con infección latente (15) (18).

La paratuberculosis es transmitida por la ruta feco-oral a través de pasturas contaminadas, agua o leche; la introducción de la enfermedad es a través de la transportación de nuevos animales (41). Los animales portadores pueden contaminar con sus heces los pastos, las



aguas superficiales, los ríos, la comida, lo que provoca un alto riesgo de exposición para el resto de animales, ya sean domésticos o salvajes (4) (43). Como el período de incubación es largo, los animales pueden excretar al agente durante 15 a 18 meses antes de presentar algún signo clínico (18).

La principal forma de transmisión es cuando el ternero recién nacido está expuesto en la maternidad a las hembras que tienen las ubres contaminadas con materia fecal o directamente por la ingesta de calostro o leche de vacas infectadas. La transmisión transplacentaria también puede ocurrir en el útero de una vaca positiva, ya sea vientre natural o receptora de una transferencia embrionaria (28).

La transmisión vertical prenatal ha sido suficientemente documentada, por ejemplo, cuando al momento del nacimiento el feto toma contacto con zonas contaminadas de la madre como la ubre. *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* ha sido aislado de tejidos fetales (membranas, cotiledones) y de tejidos maternos (endometrio, mucosa uterina), aunque esta posibilidad parece ceñirse en su gran mayoría a casos de madres clínicamente enfermas (28).

Los animales criados en un medio contaminado pueden convertirse en excretores permanentes o temporales sin llegar a presentar la enfermedad. La bacteria ha sido aislada de genitales y semen de toros infectados (2).

Investigaciones sobre la contaminación del suelo han determinado que también juega un rol en la transmisión; los suelos ácidos contienen mayor número de micobacterias, porque el hierro necesario para la multiplicación del agente aumenta la solubilidad cuando el pH del suelo disminuye y en esas regiones se registran mayor número de casos de paratuberculosis. El tiempo de supervivencia del *Mycobacterium avium* se reduce en períodos de sequía, exposición a la luz solar, pH del suelo mayor a 7 y bajo contenido de hierro (20) (47).

La tolerancia térmica de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* implica que la bacteria podría resistir la pasteurización. Varios estudios han demostrado una fuerte asociación entre paratuberculosis y enfermedad de Crohn en el hombre, y si bien se sabe

por la teoría que *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* es causa de enfermedad en el hombre, no ha sido probada ni tampoco ha sido negada (28).

## INFECCION

La infección se inicia por vía oral. Inmediatamente el agente infeccioso es captado por las células “M” en las placas de Peyer, lo que parece ser acelerado por los anticuerpos calostrales presentes en el lumen intestinal. Los macrófagos captan a las bacterias liberadas por las células “M” y se produce una diseminación de la infección clínicamente inaparente. En esta etapa se produce una reacción humoral temporaria (formación de anticuerpos) y, posteriormente, se producen lesiones en el yeyuno distal y el íleon; en este sitio se origina una enteritis crónica con tejido de granulación específico (17).

De acuerdo a la relación huésped agente que se presente los animales afectados pueden dividirse en tres grupos:

- *Resistentes a la infección:* aquellos que desarrollan rápidamente resistencia a la bacteria, controlan la infección y no se vuelven portadores contaminantes.
- *Intermedios:* la infección no está completamente controlada, algunos animales la controlan parcialmente pero excretan la bacteria de forma intermitente, mientras que otros incuban la enfermedad y excretan grandes cantidades de bacterias.
- *Clínicos:* el agente persiste en la mucosa intestinal, los gérmenes son fagocitados por los macrófagos los que proliferan e infiltran la submucosa del intestino provocando una menor absorción y diarrea crónica, se reduce la absorción de proteínas que también se pierden en el yeyuno; lo que provoca en la vaca hipoproteinemia, disminución de la masa muscular y edema (18).

Inicialmente se consideraba que la localización primaria de *Micobacterium avium subespecie paratuberculosis* después de su ingestión oral eran las tonsilas y linfonodos retrofaríngeos desde donde posteriormente se diseminaría al intestino y linfonodos mesentéricos (35). Sin embargo, estudios experimentales posteriores demostraron que la mayoría de las lesiones en los estadios iniciales de la infección se localizaban en el tejido linfoide organizado o placas de Peyer intestinales y en los linfonodos mesentéricos

asociados (5) (31) (40). Por eso, actualmente se considera que la infección paratuberculosa comienza con la invasión del tejido linfoide intestinal.

La infección con *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* presenta cuatro estadios clínicos definidos:

- *Infección latente*: terneros, novillos y vacas hasta los dos años; no presentan signos clínicos o algún cambio sobre su peso corporal o estado físico, pero los animales sí pueden excretar la bacteria. Las pruebas diagnósticas no permiten detectar la infección; sin embargo, se puede cultivar el agente a partir de heces o demostrar su presencia en tejidos (7).
- *Enfermedad subclínica*: son los portadores adultos; no presentan signos clínicos pero pueden presentar otras anomalías como mastitis o infertilidad. El cultivo de heces será negativo en la mayoría de los casos, siendo solo positivos entre el 15 y 25%. También las pruebas serológicas resultarán negativas pero si los animales no se sacrifican la enfermedad pasará al siguiente estadio (7).
- *Enfermedad clínica*: considerada la punta del iceberg refiriéndonos al número total de individuos infectados. Los signos clínicos comienzan a aparecer después de los 2 años de edad, siendo más frecuentes entre los 2 y los 6 años. Son casos esporádicos debido a la lentitud con que se disemina la enfermedad. Se observa pérdida gradual de peso pero el apetito es normal.  
Varias semanas después se presentarán cuadros de diarrea y disminuirá la producción láctea, mientras que las constantes fisiológicas permanecerán normales (F.C. 40-80, F.R. 10-30, T°. 37.7°-39°C, MR 2-3/2min) (7).
- *Enfermedad clínica avanzada*: conforme va avanzando la enfermedad, la emaciación es el signo más evidente, acompañado de edema intermandibular, que generalmente desaparecerá al iniciar las diarreas, que se observan como heces líquidas expulsadas a chorro. La enfermedad puede durar de semanas hasta meses, pero siempre terminará en deshidratación grave, emaciación y debilidad, por lo que es necesario el sacrificio del animal (7).

## FACTORES PREDISPONENTES

*Edad:* se presenta en animales muy jóvenes, generalmente con menos de 30 días, pero los signos aparecerán alrededor de los 3 a 5 años, aunque también puede presentarse a los 12 o 18 meses (7).

La susceptibilidad a infectarse es mayor en los terneros durante los primeros seis meses de vida, especialmente en los primeros 30 a 60 días. Aunque con la edad desarrollan resistencia, algunos animales adultos pueden infectarse si hay suficientes bacterias en el ambiente, alimento o agua, pero rara vez desarrollan los signos clínicos porque generalmente se descartan antes por problemas reproductivos o edad avanzada (24).

*Raza:* Todas las razas de bovinos de carne y de leche son susceptibles a la infección (24). Se presenta con mayor frecuencia en ganado lechero que en cárnico, debido al sistema de producción (18).

La deficiencia de Cu y de Se podrían afectar negativamente al sistema inmunológico del bovino y con ello la capacidad de respuesta a la infección con *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* aumentando la predisposición a que la enfermedad se manifieste (3).

Esta enfermedad se encuentra en todo el mundo principalmente en bovinos, ovinos y cabras; también se presenta en ciervos, alces, llamas, bisontes, caballos, cerdos y animales de zoológico y en las últimas décadas, también se ha descrito en conejos, armiños, zorros, comadrejas, aves carroñeras, roedores, primates y el hombre (24).

La existencia e importancia de los reservorios silvestres no se ha determinado aún y como el rango de huéspedes posiblemente sea mucho más amplio que el conocido, si se presentaran ciclos salvajes se dificultarían aún más los programas de control (15).

## ETIOLOGIA

El agente causal es una bacteria perteneciente al Orden *Actinomycetales*, Familia *Mycobacteriaceae* denominada *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*), del cual se conocen tres subgrupos diferentes de cepas; solo uno de estos ocasiona la enfermedad en el ganado vacuno y se puede cultivar a partir de las heces tras una incubación de 6 a 12 semanas (7).

El *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* es un bacilo aerobio Gram positivo, no esporoformador, con una pared celular compleja, relativamente impermeable y rica en lípidos. Su mayor constituyente es la lipoarabinosa, que es altamente inmunógena y forma la base de los inmunoensayos ligados a enzima (ELISA) (34).

Entre sus características más destacables se encuentran la de ser ácido alcohol resistente, poseer un tamaño aproximado de 1-2 $\mu$  de longitud por 0.5  $\mu$  de anchura, normalmente forma colonias rugosas y presenta una gruesa pared lipídica, semejante a las del resto de las micobacterias (42).

Generalmente presenta una tinción homogénea con los métodos de tinción y decoloración con alcohol ácido (como el de Ziehl-Neelsen) aunque, en el caso de formas de pared deficiente o inexistente y en formas más largas, no sea así (48).

Empleando el método de tinción Ziehl – Neelsen suelen adquirir una coloración uniforme aunque a veces pueden observarse formas alargadas con fragmentos sin teñir. Así mismo pueden aparecer agrupados formando nidos sobre todo en las preparaciones a partir de material patológico (42).

Es una bacteria de crecimiento lento, difícil de cultivar y que requiere un aporte externo de micobactina (10). En medio de cultivo sólido forma colonias pequeñas (1-5 mm), rugosas y generalmente no pigmentadas visibles a las 4-8 semanas aunque puede alargarse incluso hasta los 6 meses (9).

Este agente requiere medios de cultivo especiales y demora en el laboratorio 16 semanas en desarrollar; es muy resistente a las condiciones ambientales si la humedad es elevada; sobrevive, en término medio, 9 meses en el estiércol o abono fermentado, 11 meses en el suelo y 17 meses en el agua. La exposición a la luz solar directa, calor y desinfectantes específicos inactivan al microorganismo (18).

El *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* aparece tanto en los cultivos como en los tejidos como un bastoncillo corto y grueso que mide 0.5 por 1.0 micras y se considera más pequeño que cualesquier de los bacilos tuberculosos. En los tejidos y las materias fecales se hallan en general en masas, algunas de las cuales contienen cantidades considerables del microorganismo. Esta disposición es útil para su identificación (2) (18).

Como la bacteria es de crecimiento lento, en el intestino delgado del animal infectado produce una enteritis que se observa en la necropsia como un engrosamiento y plegamiento de la mucosa intestinal, con aspecto de circunvoluciones cerebrales y, por esta lesión, el animal enfermo es incapaz de absorber nutrientes (2) (7).

## **RESISTENCIA Y PERSISTENCIA**

En comparación con otras bacterias, incluidas el resto de micobacterias, *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* se caracteriza por su extremada baja actividad metabólica, lo que conlleva una velocidad de crecimiento en condiciones óptimas 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli* (34).

Esa cualidad de metabolismo ralentizado, en combinación con la defensa que le confiere la compleja pared celular, hace del *Map* una bacteria muy resistente a condiciones adversas, al mismo tiempo que le permite ser la primera en estar allí cuando estas sean más favorables (19).

Este agente requiere medios de cultivo especiales y demora en el laboratorio 16 semanas en desarrollar, es muy resistente a las condiciones ambientales si la humedad es elevada,

sobrevive término medio 9 meses en el estiércol o abono fermentado, 11 meses en el suelo y 17 meses en el agua. La exposición a la luz solar directa, calor y desinfectantes específicos inactivan al microorganismo (20) (23).

El *Map* ha sido cultivado a partir de intestino delgado, linfonodos regionales, tejido uterino, mamario, leche y materia fecal de animales infectados (21).

El microorganismo de la enfermedad muestra un grado de resistencia a las influencias nocivas semejantes a las del bacilo tuberculoso. Resiste a los ácidos y álcalis así como a la antiformina. Estas sustancias se emplean para tratar tejidos contaminados y materias fecales, con el objetivo de eliminar otras bacterias al hacer los cultivos (39).

### **IMPORTANCIA ECONÓMICA:**

A la hora de calcular el impacto económico de la paratuberculosis, las pérdidas pueden ser clasificadas como directas, indirectas o inaparentes (25).

Dentro de los costos directos, entrarían las pérdidas derivadas de la reducción productiva de animales clínicos y subclínicos, bien por descenso en la cantidad de leche producida, por descenso del valor del animal en el matadero o por el sacrificio prematuro de los mismos (6).

Se pueden considerar costos indirectos aquellos derivados de restricciones de acceso al mercado, los gastos de testado de animales para venta o exportación, así como los originados por la adopción de medidas preventivas de manejo en los grupos de cría. Entre los costos inaparentes, se encuentran la pérdida de potencial genético debido al sacrificio prematuro y las restricciones en la compraventa de animales de alto valor genético (11).

La reducción en la producción de leche en vacas clínicamente afectadas, varía de un 14,6% a un 15,9%, alcanzando hasta un 19,5% en la última lactación. Las pérdidas asociadas a animales subclínicos pueden estar relacionadas con el incremento en la incidencia de mastitis e infertilidad y con las tasas de eliminación de animales del rebaño (16) (26).

Debido tanto al desconocimiento del alcance real de la enfermedad como a las diferencias de producción y de valoración de precios existentes entre países, no existen datos absolutamente fiables de las pérdidas que provoca la paratuberculosis (28).

## **PREVALENCIA INTERNACIONAL**

La prevalencia de la PTBC en Europa oscila entre 7 y 55%; en los Estados Unidos alcanza el 40% en los rodeos de más de 300 cabezas y en Australia la prevalencia en los hatos lecheros se encuentra entre 9 y 22%. En la Argentina, datos recogidos por el grupo de investigación del INTA Balcarce, indican una seroprevalencia que varía entre 7,2 y 19,6% en rodeos de cría de la Cuenca del Salado, en la provincia de Buenos Aires (44).

En Venezuela se desconoce este índice, donde comúnmente no se realizan pruebas rutinarias para el diagnóstico de PTBC, aunque se reconoce la presencia de la enfermedad desde 1970 (23). En Monagas se ha confirmado mediante clínica y hallazgos histopatológico, casos puntuales (1).

Esta enfermedad tiene una alta prevalencia en muchos países (36). Actualmente existe gran preocupación entre los productores de ganado bovino en el sur de Chile por confirmar su diagnóstico (22). Aunque en Chile no existen antecedentes oficiales sobre prevalencia de Paratuberculosis bovina, es posible sospechar que existe un elevado porcentaje de rebaños infectados, especialmente rebaños lecheros. Datos no publicados del Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.), Ministerio de Agricultura revelan que en 1996 un monitoreo realizado en la V, VI, VII y Región Metropolitana detectó un 36.9% de rebaños positivos de un total de 84 examinados y 2.8% de animales positivos de un total de 1855 examinados con ELISA (IDEXX, USA).

En Argentina la seroprevalencia de establecimientos infectados para las zonas de cría varían entre el 7 y 20 % (es más elevada en los campos de cría de la cuenca del Salado, Provincia de Buenos Aires. Argentina). De acuerdo a un estudio realizado en hatos de cría en de la zona de Sampacho (suroeste de la provincia de Córdoba), se observó una prevalencia serológica del 0,3 % en animales y un 5,3 % en establecimientos.



En la región centro-sur de Córdoba, entre los Laboratorios de diagnóstico de la UNRC y el Laboratorio de Salud Animal (LASA) en los últimos 2 años recibieron 9 casos con diagnóstico de Paratuberculosis, de los cuales 4 pertenecían a tambos, 4 a hatos de cría y 1 de una cabaña. Las técnicas utilizadas para llegar a estos diagnósticos fueron: coloraciones de Ziehl Neelsen (sobre materia fecal y/o órganos afectados), serología (ELISA), anatomopatología, histopatología y cultivo (33).

## **DIAGNOSTICO POR LA PRUEBA ELISA INDIRECTO**

La prueba está diseñada para la detección de anticuerpos frente a *Mycobacterium avium* *supespecie paratuberculosis* en muestras individuales de suero plasma y leche en bovinos.

Este método de fácil automatización, capaz de procesar un elevado número de muestras, generalmente de gran sensibilidad y especificidad.

Se emplea en programas de saneamiento junto a otras técnicas como el AGID, para el diagnóstico individual. A pesar de las desventajas antes mencionadas, resulta de utilidad en la prospección de colectividades (37).

En este caso la detección de la presencia de anticuerpos se basa en el contacto del suero problema y un antígeno (generalmente purificado) fijado a la placa. El revelado se realiza con otro anticuerpo anti especie marcado, quien a su vez reacciona con un sustrato provocando un cambio de color.

Este, se cuantifica mediante un lector de densidad óptica (38).

El empleo de diversos antígenos y/o un antígeno comercial protoplásmico de estas características, ha logrado una especificidad del 80% y una sensibilidad del 94% (52).

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y METODOS**

El Cantón Mejía es un cantón de la Provincia de Pichincha. Se encuentra ubicado al suroriente de la Provincia. Tiene tres zonas que se distinguen según la calidad del suelo, las tres zonas son muy ricas para la ganadería, existe una vasta superficie de pastos naturales así como pastos plantados que se encuentran sobre todo en la parte occidental. Constituye un importante centro de producción agropecuaria, donde la explotación ganadera juega un papel importante en su desarrollo.

Las características climáticas y clasificación ecológica del cantón mejía puede verse en el cuadro N°1 y N°2.

**CUADRO N°.1 Características climáticas del Cantón Mejía.**

Altitud	600 – 4750 m.s.n.m.
Latitud	0° 31` - 0° 10` sur
Longitud	78° 32` - 78° 35` oeste
Temperatura	11.9° C
Precipitación	131 mm
Nubosidad anual	6 octavos
Heliofonia	1588 horas luz/año
Humedad	77.6%

Fuente: INHAMI (2011)

## CUADRO N°.2 Clasificación Ecológica del Cantón Mejía

Bosque muy Húmedo Montano
Bosque Húmedo Montano Bajo
Paramo muy húmedo Sub Alpino
Paramo Pluvial Sub Alpino

Fuente: INHAMI (2011)

## MATERIALES

### Equipos y materiales de laboratorio

- ✓ 384 Muestras de suero bovino
- ✓ Centrífuga
- ✓ Micropipeta de 10 a 100  $\mu$ l
- ✓ Micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ l.
- ✓ Micropipeta multicanal de 10 a 100  $\mu$ l.
- ✓ Refrigerador
- ✓ Congelador
- ✓ 500 Tubos eppendorf
- ✓ 500 tubos de ensayo
- ✓ Guantes descartables
- ✓ 800 Puntas descartables para micropipeta
- ✓ Kit ELISA Indirecto (Casa comercial IDDEX):

- 5 placas recubiertas *Map* antígeno
- Solución de lavado (20X)
- Muestra de diluyente, verde
- Conjugado diluyente, azul
- Control positivo
- Control negativo
- Conjugado anti bovino HRPO conservado contimerosal
- Solución de sustrato TMB
- Solución stop

- ✓ Microscopio
- ✓ Cámara fotográfica
- ✓ Cámara de video
- ✓ Microlector de Elisa
- ✓ Agitador de placas
- ✓ Lavadora de microplacas
- ✓ Computador
- ✓ Impresora
- ✓ Material de escritorio

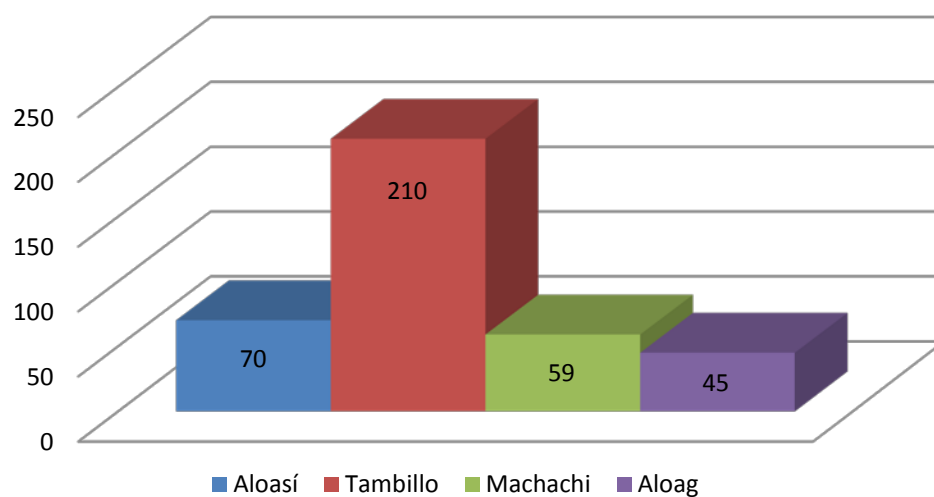
**CUADRO N°. 3 Nombre de las ganaderías, ubicación y número de sueros  
Bovinos utilizados en la prueba Elisa Indirecto.**

HACIENDAS	N° PREDIO	PARROQUIA	TOTAL DE SUEROS	
			N°	%
El Tambo Bajo	Predio 1	ALOASI	70	18,23
	<b><i>SUBTOTAL</i></b>		<b>70</b>	<b>18,23</b>
Miraflores N°2	Predio 2	TAMBILLO	42	10,94
Rancho chico 1	Predio 3		31	8,07
Rancho Chico II	Predio 4		8	2,08
La Estancia	Predio 5		7	1,82
Tambillo Alto	Predio 6		20	5,21
Casiganda	Predio 7		92	23,96
La giralda	Predio 8		10	2,6
	<b><i>SUBTOTAL</i></b>		<b>210</b>	<b>54,68</b>
Taguachi	Predio 9	MACHACHI	10	2,6
San Agustín de Peña	Predio 10		19	4,95
La María	Predio 11		10	2,6
Unagua	Predio 12		10	2,6
La Lola	Predio 13		10	2,6
	<b><i>SUBTOTAL</i></b>		<b>59</b>	<b>15,35</b>
Hualilahua Jijón	Predio 14	ALOAG	26	6,77
El Calvario	Predio 15		6	1,56
Churumbela	Predio 16		5	1,3
La concepción	Predio 17		8	2,08
	<b><i>SUBTOTAL</i></b>		<b>45</b>	<b>11,71</b>
	<b>TOTAL</b>		<b>384</b>	<b>100</b>

Fuente: Investigación Directa

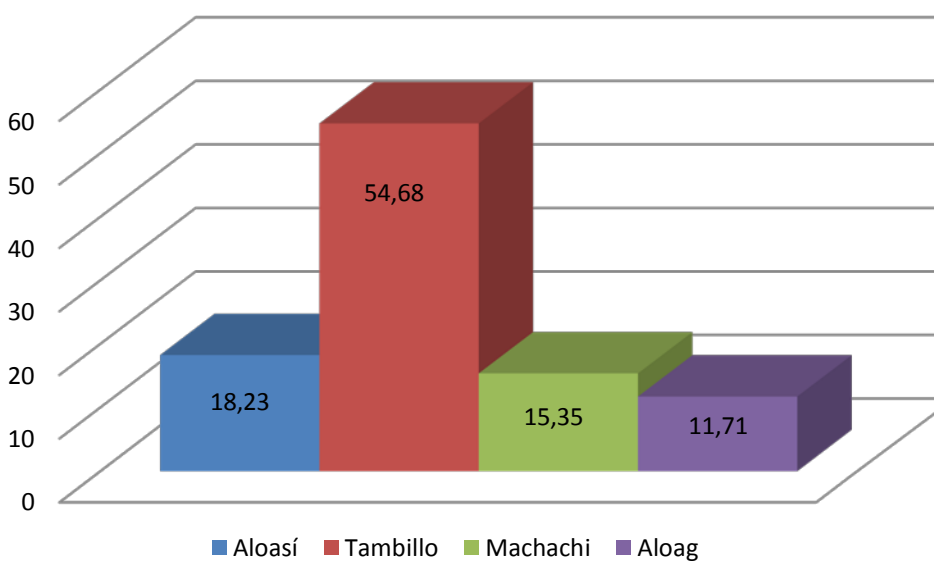
Elaboración: Los autores

\* La diferencia de número de sueros bovinos utilizados en cada parroquia  
Obedece a una selección al azar de una base de datos de banco de sueros de la  
asociación Holstein Friesian del Ecuador.



**GRAFICO N .1** Numero de sueros bovinos por parroquia para la prueba Elisa Indirecto en el Cantón Mejía.

Fuente: Investigación Directa  
Elaboración: Los autores



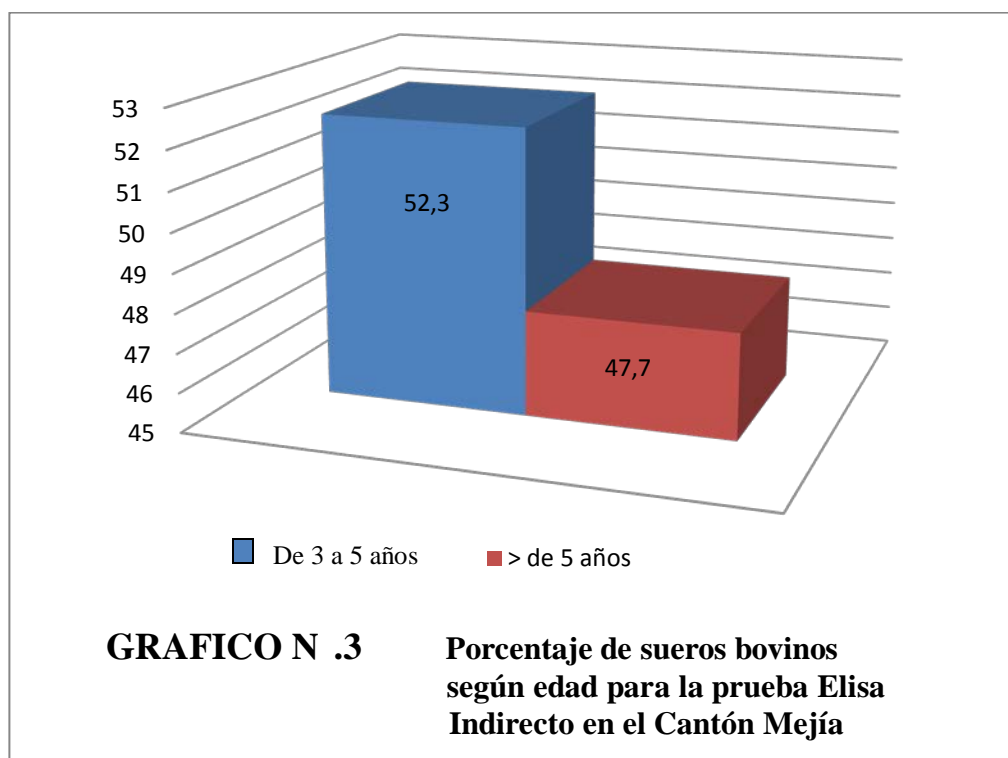
**GRAFICO N .2** Porcentaje de sueros bovinos por parroquia para la prueba Elisa Indirecto en el Cantón Mejía.

Fuente: Investigación Directa  
Elaboración: Los autores

**CUADRO N°. 4 Total de sueros bovinos según las edades utilizadas en la Prueba Elisa Indirecto**

EDAD	Total Sueros	
	Nº	%
De 3 a 5	201	52,3
> De 5 años	183	47,7
<b>TOTAL</b>	<b>384</b>	<b>100,0</b>

Fuente: Investigación Directa  
Elaboración: Los autores



Fuente: Investigación Directa  
Elaboración: Los autores

## **MÉTODOS**

La presente investigación se realizó en sueros sanguíneos de bovinos de 4 Parroquias (Tambillo, Machachi, Alóag y Aloasí) pertenecientes al Cantón Mejía; las muestras pertenecen al banco de sueros de La Asociación Holstein Friesian del Ecuador.

Se trabajó con 384 sueros de vacas en lactancia seleccionados al azar.

### **Método de selección**

- La preselección de los sueros en estudio se hizo en base a un banco de sueros existentes en la Asociación Holstein Friesian del Ecuador, a los que se los clasificó por predios y su ubicación.
- Luego se acudió a una base de datos la cual nos proporcionó las edades de los animales y se realizó una selección de los sueros de acuerdo a los registros de las edades de los animales.
- Los sueros bovinos se dividieron por parroquias, de acuerdo a la ubicación de las haciendas o predios de las que fueron tomadas las muestras durante el periodo 2010.
- La selección del número de muestras se realizó mediante la fórmula aplicada a una población infinita como lo menciona (Sierra Bravo).



## Prueba ELISA Indirecto

El diagnostico se realizó con *Mycobacterium Paratuberculosis Antibody Test* Kit de procedencia Francesa adquirida a través de los laboratorios IDEXX.

A continuación la cronología y el protocolo que se siguieron:

- Notificación al Director de la Asociación Holstein Friesian el día de inicio de las pruebas de laboratorio y el tiempo de duración de las mismas.
- Selección de los sueros sanguíneos de hembras bovinas del banco de sueros, los que se agruparon en gradillas de acuerdo al predio al que pertenecen.
- Una vez seleccionados los sueros se procedió a llenar la hoja de registro con los siguientes datos de la vaca: nombre/número, edad, resultado.
- Se procedió a la realización de la prueba Elisa Indirecto:
  1. Colocar en la mesa las placas cubiertas de antígeno y registrar la posición de cada muestra de suero bovino.
  2. Diluir en tubos de ensayo las muestras de suero sanguíneo en el diluyente de la muestra en el factor de dilución recomendada (1/20) y permitir que se incube durante 15 minutos a dos horas a temperatura ambiente 18°-25°C
  3. Agregar 100  $\mu$ L de control positivo diluido en dos pozos del antígeno recubierto en placas revestidas.
  4. Agregar 100  $\mu$ L de control negativo diluido en dos pozos del antígeno recubierto en placas revestidas.
  5. Dispensar 100  $\mu$ L de cada suero diluido en cada pozo de la placa.
  6. Cubrir la placa de incubar durante 45 minutos  $\pm$  3 minutos a temperatura ambiente 18°- 25°C.
  7. Aspirar el contenido líquido de los pozos en un depósito adecuado de desechos.
  8. Lavar cada pocillo tres veces con aproximadamente 300  $\mu$ L de solución de lavado. Aspirar el líquido de todos los pozos después de cada lavado.

9. Agregar 100 $\mu$ L de HRPO conjugado diluido en cada pocillo.
10. Cubrir la placa e incubar durante 30 minutos  $\pm$  3 minutos a temperatura 18°- 25°C.
11. Aspirar el contenido líquido de los pozos y colocaren un depósito adecuado de residuos.
12. Lavar cada pocillo tres veces con aproximadamente 300 $\mu$ L de solución de lavado. Aspirar el líquido de todos los pozos después de cada lavado.  
Después de la aspiración de líquido de lavado final, realizar un secado suave pero firmemente con una toalla absorbente.
13. Dispensar 100 $\mu$ L de solución de sustrato TMB en cada pocillo.
14. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente 18°- 25°C.
15. Verter 100  $\mu$ L de solución stop en cada pocillo de la placa de prueba para detener la reacción.
16. Leer las densidades ópticas a 450nm (OD.450), dos lecturas de cada placa.

El diagnostico se lo definió de la siguiente forma: comparando la densidad óptica (DO) de la muestra con la media del control positivo.

El control positivo se ha normalizado y representa un nivel de anticuerpos significativo de *Map* en suero bovino.

La reacción es considerada válida si la media del control positivo (CPx) tiene un valor mínimo medio de OD 450 de 0.350 y si el coeficiente entre la media del control positivo (CPx) y el control Negativo (CN A 450) es igual o superior a 3,00

**POSITIVO:** si la relación  $S / P$  es mayor o igual a 0,70, la muestra de suero bovino está clasificado como positivo para los anticuerpos *Map*.

**SOSPECHOSO:** si la relación  $S / P$  es mayor 0,60 o menor de 0,70 la muestra de suero bovino está clasificada como sospechosa para los anticuerpos *Map*.

**NEGATIVO:** muestras de suero bovino con  $S / P$  igual o inferior a 0,60 se consideran negativos para los anticuerpos *Map*.

17. Con la información obtenida se procedió a calcular los resultados porcentuales de la siguiente manera:

Porcentaje (%) de positivos según, predio, edad.

Porcentaje (%) de sospechoso según, predio, edad.

Porcentaje (%) de negativos según, predio, edad.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

El análisis de los datos obtenidos de la prueba Elisa Indirecto nos dan los siguientes resultados:

#### Resultados por positividad

**CUADRO N°. 5 Resultados de la prueba Elisa Indirecto.**

<b>Resultados</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b>Positivos</b>	28	7,29
<b>Negativos</b>	351	91,39
<b>Sospechosos</b>	5	1,35
<b>Total</b>	384	100

Fuente: Investigación Directa

Elaboración: Los Autores

- De un total de 384 sueros bovinos, se obtuvo 28 sueros positivos, lo que corresponde a una seroprevalencia de 7,29% y 351 sueros bovinos negativos que corresponden a una seroprevalencia de 91,39% y por último 5 sospechosos que corresponden a 1,35% de sueros bovinos.
- Estos resultados indican que se encuentra en relación con datos de otros países como Argentina en el que la prevalencia clínica varía entre 7,2% y 19,6% en hatos de cría de la Cuenca del Salado, en la provincia de Buenos Aires (44).

## Resultados por predios

**CUADRO N°.6 Resultados de la prueba Elisa Indirecto según**

**Parroquias del cantón Mejía.**

PARROQUIA	N° PREDIO	TOTAL DE SUEROS		POSITIVOS		SOSPECHOSOS		NEGATIVOS	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
ALOASI	Predio 1	70	18,23	8	11,43	1	1,43	61	87,14
	<b>SUBTOTAL</b>	<b>70</b>	<b>18,23</b>	<b>8</b>	<b>11,42</b>	<b>1</b>	<b>1,43</b>	<b>61</b>	<b>87,14</b>
TAMBILLO	Predio 2	42	10,94	3	7,14	0	0,00	39	92,86
	Predio 3	31	8,07	4	12,90	0	0,00	27	87,10
	Predio 4	8	2,08	0	0,00	0	0,00	8	100,00
	Predio 5	7	1,82	0	0,00	0	0,00	7	100,00
	Predio 6	20	5,21	0	0,00	0	0,00	20	100,00
	Predio 7	92	23,96	4	4,35	2	2,17	86	93,48
	Predio 8	10	2,6	1	10,00	0	0,00	9	90,00
	<b>SUBTOTAL</b>	<b>210</b>	<b>54,68</b>	<b>12</b>	<b>5,71</b>	<b>2</b>	<b>0,95</b>	<b>196</b>	<b>93,33</b>
MACHACHI	Predio 9	10	2,6	0	0,00	0	0,00	10	100,00
	Predio 10	19	4,95	4	21,05	0	0,00	15	78,95
	Predio 11	10	2,6	0	0,00	0	0,00	10	100,00
	Predio 12	10	2,6	0	0,00	0	0,00	10	100,00
	Predio 13	10	2,6	0	0,00	0	0,00	10	100,00
	<b>SUBTOTAL</b>	<b>59</b>	<b>15,36</b>	<b>4</b>	<b>6,78</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>55</b>	<b>93,22</b>
ALOAG	Predio 14	26	6,77	4	15,38	1	3,85	21	80,77
	Predio 15	6	1,56	0	0,00	0	0,00	6	100,00
	Predio 16	5	1,3	0	0,00	1	20,00	4	80,00
	Predio 17	8	2,08	0	0,00	0	0,00	8	100,00
	<b>SUBTOTAL</b>	<b>45</b>	<b>11,71</b>	<b>4</b>	<b>8,89</b>	<b>2</b>	<b>4,44</b>	<b>39</b>	<b>86,55</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>384</b>	<b>100</b>	<b>28</b>	<b>7,29</b>	<b>5,00</b>	<b>1,35</b>	<b>351</b>	<b>91,39</b>

Fuente: Investigación Directa

Elaboración: Los Autores

En la parroquia Aloasí se seleccionaron 70 sueros bovinos dando como resultado 8 sueros positivos que corresponde a un porcentaje de positividad del 11,42%, siendo la parroquia con el mayor porcentaje (Cuadro N°. 2).

En la parroquia de Tambillo se seleccionaron 210 sueros bovinos, el porcentaje de positividad fue de 5,71%, observándose que 4 de los 7 predios tuvieron reactores positivos. El predio N°3 fue el de mayor positividad con el 12,90%, seguido por el predio N°2 con 7,14%, el predio N°7 con 4,35% y el predio 8 con el 10% (Cuadro N°3).

En la parroquia Machachi se seleccionaron 59 sueros bovinos que significa el 15,36%, del total de sueros, provenientes de 5 predios de los que se obtuvieron 4 sueros positivos que corresponden a 6,78%. En el predio N° 10 se obtuvieron 4 sueros positivos de 19 sueros, lo que representa el 21,05% de positividad, siendo la hacienda con mayor positividad de las muestreadas del cantón (Cuadro N°3).

En la parroquia de Aloag se tomaron 45 sueros bovinos pertenecientes a 4 predios, obteniéndose 4 sueros positivos que corresponden al 15,38% (Cuadro N°3).

Los resultados obtenidos no reflejan la realidad pero reflejan la positividad que existe en los predios pertenecientes al Cantón Mejía.

## Según Edad

**CUADRO N°. 7 Resultados de la prueba Elisa Indirecto según edad de Vacas en el Cantón Mejía.**

<b>EDAD AÑOS</b>	<b>Total Sueros</b>		<b>Positivos</b>		<b>Sospechosos</b>		<b>Negativos</b>	
	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
De 3 a 5	201	52,3	19	9,45	3	1,49	179	89,05
> De 5	183	47,7	9	4,91	2	1,09	172	93,99
<b>TOTAL</b>	<b>384</b>	<b>100,0</b>	<b>28</b>	<b>7,28</b>	<b>5</b>	<b>1,3</b>	<b>351,0</b>	<b>91,4</b>

Fuente: Investigación Directa

Elaboración: Los Autores

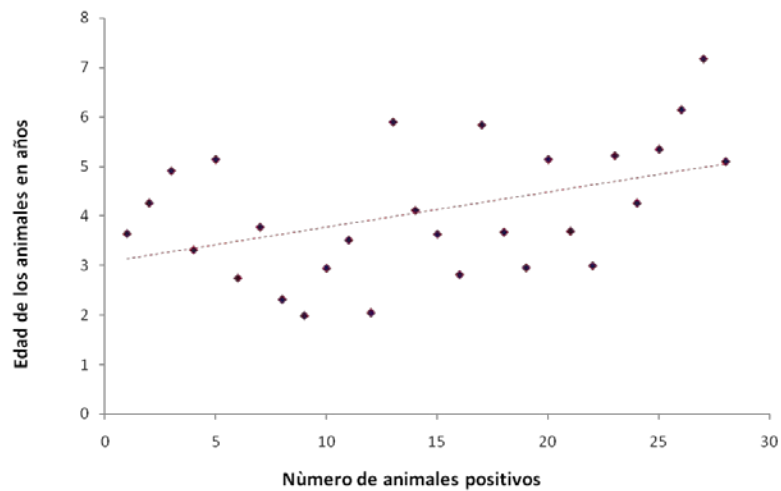
Se puede apreciar que en los animales entre 3 a 5 años hubo 19 sueros positivos que representan el 9,45% de seroprevalencia. En esta edad los bovinos no presentan signos clínicos pero pueden presentar otras anomalías, como mastitis o infertilidad lo que confirma lo citado por varios autores (7).

En los animales mayores de 5 años los sueros positivos fueron 9 que representan el 4,91% de seroprevalencia, en este caso, la menor incidencia en estos animales se debe a que son descartados del hato al presentarse otras enfermedades o porque los síntomas de la enfermedad son confundidos con otras posibles enfermedades (7).

## Resultados $\chi^2$

La prueba  $\chi^2$  es igual a 7.86 comparando los resultados obtenidos con los datos calculados, demuestra que sí existe una diferencia altamente significativa entre la edad de los animales 1% de significancia.

## Resultados Correlación



Fuente: Investigación Directa  
Elaboración: Los autores

**Gráfico N°4.- Correlación de los resultados obtenidos en la prueba**

**Elisa Indirecto.**

Los resultados obtenidos indican una correlación lineal positiva pero débil, la edad de los animales está relacionada con la presencia de animales positivos aunque los signos son confundidos con otras enfermedades conforme avanza la edad.



## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **CONCLUSIONES**

Del trabajo para la determinación de la prevalencia de paratuberculosis bovina en una muestra de sueros bovinos del Banco de sueros de la asociación Holstein Friesian correspondientes al Cantón Mejía, se desprende lo siguiente:

1. La Paratuberculosis bovina está presente en un alto porcentaje en los sueros de los hatos bovinos muestreados.
2. La edad de mayor seroprevalencia se presentan en los animales que se encuentran en las edades de 3 a 5 años.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar el diagnóstico de la paratuberculosis bovina utilizando la técnica Elisa Indirecto ya que es una herramienta confiable para la identificación del *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis (Map)* por su fácil ejecución y poder así diagnosticar precozmente los positivos serológicos.
2. Se debería complementar este estudio con un cultivo de heces en los hatos bovinos para aislar el agente causal de la enfermedad.
3. Se requieren trabajos que mejoren el conocimiento de la Paratuberculosis bovina en el país a fin de generar más información confiable para la toma de decisiones que busquen su control y erradicación.
4. Se recomienda a la Asociación Holstein Friesian del Ecuador realizar un diagnóstico en todas las haciendas registradas.
5. Se recomienda al Ministerio de Agricultura y Ganadería – AGROCALIDAD del Ecuador, implementar un Programa Nacional para el Diagnóstico, Control y Erradicación de la paratuberculosis bovina.

## CAPITULO VI

### BIBLIOGRAFIA

1. ALFARO, C. (2001) Bioseguridad como componente de los programas sanitarios para minimizar el riesgo de TBC y PTBC en las explotaciones ganaderas. En: Boletín Agropecuario, Fundación INLACA. Año 3. N° 11. 31-34 p.
2. BARCLAY, R., Ewing, D.F., Ratledge, C. (1985) Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Bacteriol. 164, 896-903.
3. BENEDICTUS, G., Dijkhuizen, A.A. & Stelwagen, J. (1987) Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet; 121:142-146.
4. BOEVER WJ y Peters D. (1974) Paratuberculosis in two herds of exotic sheep. J.Am.Vet.Med.Assoc., 165(9):822
5. BROTHERTON, J.B., Gilmour, N.J.L., Mc Samuel, J. (1961) Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. J. Comp. Pathol. 71, 286-299.
6. BUERGELT CD, Hall C, McEntee K y Duncan JR. (1978). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. Vet.Pathol., 15:196-206
7. DARGATZ, D., Garry, F., Hansen, D., CHARMBERLAIN, W., (2001) *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 15 (3): 337-346.
8. CHIODINI, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. Cornell Vet. 74, 218-262.
9. COCITO, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., Vannuffel, P. (1994) Paratuberculosis. Clin. Microbiol. Rev. 7, 328-345.

10. COLLINS, M.T. & Morgan, I.R. (1991) Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. JAVMA. 199 (12): 1724-1729.
11. Rossiter, C. & Roussel, A. (1999) What do I need to Know about Johnes's diseases in beef cattle United States Department of Agriculture.Veterinary Services. Available in: <http://www.paratuberculosis.org/links>
12. GOODGER, W.J., Collins, M.T., Nordlund, K.V., Eisele, Ch., Pelletier, J., Thomas, Ch. B. & Sockett, D.C. (1996) Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of Mycobacterium paratuberculosis infections in dairy cattle. JAVMA. 208 (11): 1877-1881
13. HARRIS, N.B. & Barletta, R.G. (2001) Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. Clinical Microbiology Reviews. 2001; 14 (3): 489-512
14. HOLZMANN, C.B., Traversa, M.J., Schettino, D.M., Medina, L. y Bernardelli, A. (2004) Estudio del comportamiento epidemiológico de la paratuberculosis bovina mediante series cronológicas en Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 23 (3):791-799.
15. HUTCHINSON, L.J. (1996) Economic impact of paratuberculosis. Vet. Clin. of North America. Food Animal Practice.12 (2):377-381
16. JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.J. & Kaneene, J.B. (1997) Relationship between soil type and Mycobacterium paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 210: 1735-1740
17. JUSTE RA, Aduriz G, Bascones M, Foley E, Bargar TW y Barletta RG. (1993) Effect of iron on mycobactin production and dependence in Mycobacteria. Proc.74th Annu.Meet., Chicago, IL, USA. p. 64.
18. KENNEDY, D.J. y Benedictus, G. (2001) Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in agricultural species. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 2001; 20 (1):151-170.
19. KÖRMENDY, B., Kopál, T., Bálint, T., Szilágyi, M. & Béki, L. (1989) Economic losses caused by paratuberculosis in a dairy herd: Case report. Acta Veterinaria Hungarica. 37(1-2):45-53.
20. KRUIZE, J., J. P. SOTO, S. LEIVA. (2001) Diagnóstico bacteriológico y serológico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros del sur de Chile. Proc. XXIV Reunión anual SOCHIPA. Santiago, Chile. pp. 532-533.
21. LÓPEZ, NANCY DE, ROLO, M. y Palencia, L. (1996) Paratuberculosis o enfermedad de Jhone, un problema sanitario económico que afecta la ganadería venezolana. 3er Congreso

- de Ciencias Veterinarias. "Eduardo Mendoza Goiticoa". Maracay, Ven. Memorias. 34-41 pp.
22. MANNING, E.J.B. & Collins, M.T. (2001) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2001; 20 (1):133-143.(13)
  23. MERKAL R.S. (1983) Report on the International Colloquium on research in paratuberculosis. National Animal Disease Center, Ames,Iowa. Pp.18.
  24. MERKAL, R.S., Curran, B.J. (1974) Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.* 28, 276-279.
  25. MEYER, L. A. & Hall, H.H. (1994) Economic Analysis of the Impact of Paratuberculosis on the Kentucky Cattle Industry. University of Kentucky. Department of Agricultural Economics. p 7.
  26. MILNER, A.R.; Lepper, A.W.D.; Gruner, E.; Symonds, W.N. (1987) Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei*. *Res. Vet. Sci.* 42: 140—144.
  27. MOREIRA, A. N. y Tosi, J.C. (1994) Paratuberculosis bovina. Importancia de la enfermedad en la región. ¿Es posible su control? Informe Técnico N° 1. Estación Experimental INTA Balcarce. 14 p.
  28. NISBET, D.I., Gilmour, N.J.I., Brotherston, J.G. (1962) Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep. *J. Comp. Pathol.* 72, 80-91.
  29. OTT, S., Wells, S.J. & Wagner, B. A. (1999) Herd- level economic losses associated with Johne's diseases on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40(3-4):179-92.
  30. PAOLICCHI, F. y Späth. E. (2000) Paratuberculosis: una enfermedad emergente de impacto en nuestros rodeos bovinos. XIII Reunión Técnica de la AAVLD. Merlo. San Luis. Argentina., pp 11-16
  31. PAVLK L., Dvorska L., Svastova P., Rychlk I. (1999) Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis form *Mycobacterium avium* subespecies paratuberculosis. *J Microbiol Meth* 1999; (38): 155-167.
  32. PAYNE, J.M., Rankin, J.D. (1961). The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res. Vet. Sci.* 2, 167-174.
  33. RIEMMANN, H. P., B. Abbas. (1983) Diagnosis and Control of Bovine Paratuberculosis (Johne's Disease). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 27: 481-506.

34. RIDGE, S.E.; Morcan, I.R.; Sockett, D.C.; Collins, M.T.; Condrón, R.J.; Skilbeck, N.W.; Webber, J.J. (1991) Comparison of the John's absorbed EIA and the complement fixation test for the diagnosis of John's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68 (8): 253-257.
35. SANCHEZ VIZCAÍNO, J.M.; Cambra Alvarez. (1981). Técnicas Inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal. monografías INIA 29. mapa.
36. SCHWARTZ, B.D., De Voss, J.J. (2001) Structure and absolute configuration of mycobactin J. *Tetrahedron Letters* 42, 3653-3655
37. SIGURDARDOTTIR, O.G., Press, C.M., Saxegaard, F., Evensen, O. (1999) Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goats kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 36, 542-550.
38. SWEENEY RW. (1996) Transmission of paratuberculosis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim.Pract.*, 12(2):305-12.
39. TIWARI A. JONN A., Leewen V., Shawn L., McKenna, Keefe G., Barkema H. (2006) John's disease in Canada Part I: Clinical symptoms pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J.* Vol 47:874-882. D
40. TRAVERSA, M. J., Alcobedo, J., Schettino, D.M., Sanz, H. E., Rodríguez, E. M., Olmos, M. (2005) Análisis económico de un rodeo de cría con paratuberculosis clínica ubicado en el oeste de la provincia de Buenos Aires. Resumen aceptado para el 28º Congreso Argentino de Producción Animal. 19-21 de Octubre de 2005. Bahía Blanca. Buenos Aires. Argentina., p 25
41. VALENTIN-WEIGAND P., Goethe R. (1999) Pathogenesis of *Mycobacterium Avium* *Subspecies paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions and answers. *Microbes and Infection.* 1:1121-1127
42. VAN LEEUWEN, J. (2004) Impacts and Control of Insidious Infections Disease- Beat Them Before They Beat You and Your Clients. 23rd World Buiatrics Congress. Quebec City. Canadá. 11 al 16 de agosto de 2004; p 6.
43. WARD, M.P. (2004) Association between soil type and paratuberculosis in cattle herds. *Am. J. Vet. Res.* 65 (1):10-14.
44. WAYNE LG y Kubica GP. (1986) *Mycobacteria*. Family *Mycobacteriaceae* Chester 1897. En: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp. 1436-57. Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA
45. WEIGAND, P.V. Paratuberculosis. (2002) XXII Congreso Mundial de Buiatría, Hannover. Alemania. 18-23 de agosto de 2002. pp 8-20

46. WHAN, L.B., Grant,I.R., Ball, H.J., Scott, R. & Rowe, M.T. (2001) Bactericidal effect of chlorine on Mycobacterium paratuberculosis in drinking water. Letters in Applied Microbiology. 33:227-231.
47. WHITLOCK, R.H. & Buergelt, R.H. (1996) Preclinical and Clinical manifestatos of Paratuberculosis (including pathology). Vet. Clin. of North America. Food Animal Practice. 12(2):345-356.
48. YOKOMIZO, Y.; YUGI, H.; MERKAL, R.S. (1985) A method for avoiding false positive reactions in Enzyme Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of bovine Paratuberculosis. Jap. J. Vet. 5. 47 (1): 111- 119.

## **NETGRAFÍA**

1. CANO J, Camacho L. (2005)Paratuberculosis Bovina. UNAM. , México. Recuperado el 25 de marzo del 2012: [www.fmvez.unam.mx/.../paratuberculosis%20bovina.doc](http://www.fmvez.unam.mx/.../paratuberculosis%20bovina.doc)
2. JORGE M, Traversa M, Schettino D, Fresneda K y Mendivil M. Argentina (2005)Epidemiología e importancia económica de la paratuberculosis bovina.Recuperado el 2 de abril del 2012: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
3. MERCK VETERINARI MANUAL. (2008) Introducción de la paratuberculosis. Recuperado el 5 de abril del 2012: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc55900.Htm&word=paratuberculosis>.
4. TEJEDOR., M, (2002) Estudio Epidemiológico de la Paratuberculosis ovina en la provincia de Segovia.Recuperado el 28 de abril del 2012: <http://www.ucm.es/BUCEM/tesis/19911996/D/2/AD2002201.pdf>

## **CAPITULO VII**

### **ABREVIACIONES**

#### **Términos teóricos**

<b>Cu:</b>	Cobre
<b>EEUU:</b>	Estados Unidos de América.
<b>Fc:</b>	Frecuencia cardiaca.
<b>Fr:</b>	Frecuencia respiratoria.
<b>INTA:</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
<b>LASA:</b>	Laboratorio de Salud Animal
<b>Map:</b>	<i>Micobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> .
<b>PTC:</b>	Paratuberculosis bovina
<b>pH:</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>Se:</b>	Selenio.



**S.A.G:** Servicio Agrícola y Ganadero.

**T°:** Temperatura.

**UNRC:** Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Términos de Laboratorio**

**AGID:** Agar gel inmunodifusión

**Do:** Densidad óptica

**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay.

**ul:** Microlitros.

## ANEXOS VIII

### ANEXO A

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
“PRUEBA ELISA INDIRECTO”**

*Placa*

*N°  
Predio*

*Fecha*

#### UBICACIÓN DE LOS SUEROS EN LA PLACA

	NUMERO O NOMBRE DEL SUERO BOVINO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>												
<b>B</b>												
<b>C</b>												
<b>D</b>												
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												

## ANEXO B

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
“RESULTADOS PRUEBA ELISA INDIRECTO”**

*Placa*

NCx =

*Fecha*

PCx =

**DENSIDADES OPTICAS**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**ANEXO C**

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TESIS GRADO  
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA MEDIANTE LA  
PRUEBA DE ELISA INDIRECTO EN VACAS LECHERAS DEL CANTÓN MEJÍA  
REGISTRADAS EN LA ASOCIACIÓN HOLSTEIN FRIESIAN DEL ECUADOR**

Sr. Gustavo Navarro

Director Asociación Holstein Friesian Del Ecuador

Presente

Mediante el presente, nos permitimos informar los resultados obtenidos de la prueba de Elisa Indirecto realizada en el laboratorio de dicha institución.

Total de sueros bovinos: 384 que corresponden a 17 haciendas.

Sueros que dieron positivos a la prueba Elisa Indirecto: 28 que dan un porcentaje del 7,29%

No se recomienda ningún tratamiento debido a que los signos clínicos se presentan en estadios avanzados de la enfermedad.

Se debe identificar y eliminar casos clínicos y animales con infección subclínica, identificar y retirar animales positivos a pruebas serológicas, cuidado e higiene de los animales para evitar la diseminación, buscando prevenir la infección en terneros recién nacidos, vacunación, pero esta última previene solo la enfermedad clínica, no la infección.

Se recomienda repetir la prueba cada 6 meses.

Particular que ponemos a su conocimiento para los fines consiguientes.

Atentamente,

  
Mayra Cajilema  
Egresada de Facultad

  
Doris Oña  
Egresada de Facultad

## **ANEXO D**

### **PREPARACIÓN DE LOS TUBOS DE ENSAYO A SER ETIQUETADOS**

**D1**



**D2**



### **SELECCIÓN DE SUEROS POR PREDIOS**

**D3**

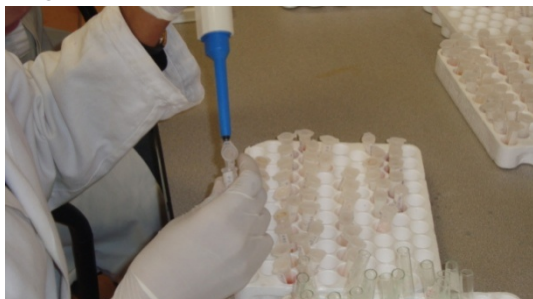


**D4**



### **DILUICION DE LAS MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO EN EL DILUYENTE**

**D5**



**D6**



## **ANEXO E**

**INCUBACIÓN DURANTE 15 MINUTOS A DOS HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE  
18°-25°C**

**E1**



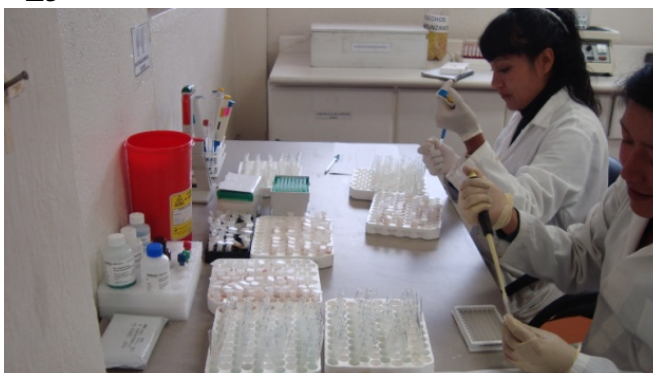
**AGREGACION DE CONTROL POSITIVO Y CONTROL NEGATIVO**

**E2**



**COLOCACION DE SUEROS EN LA PLACA**

**E3**

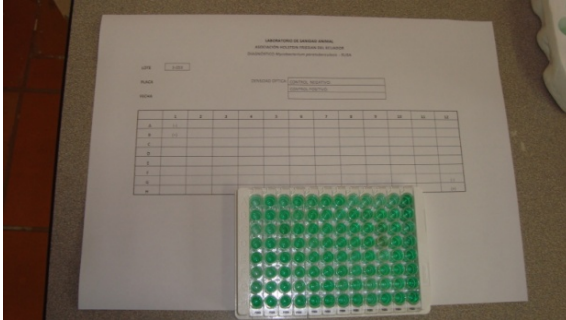




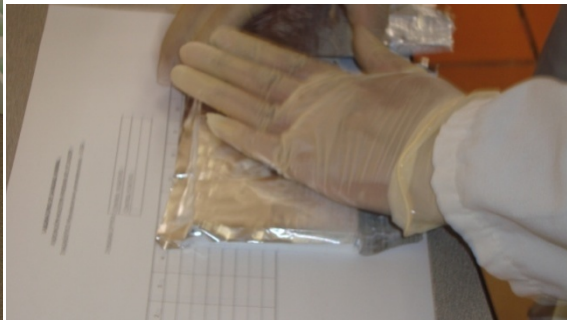
## ANEXO F

### INCUBACION DURANTE 45 MINUTOS A TEMPERATURA 18° - 25° C.

**F1**



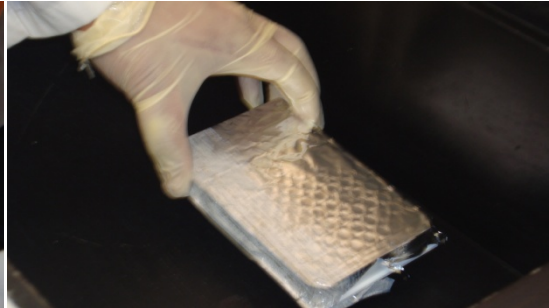
**F2**



**F3**



**F4**



### PREPARACION DE LA SOLUCION PARA EL LAVADO

**F5**



**F6**



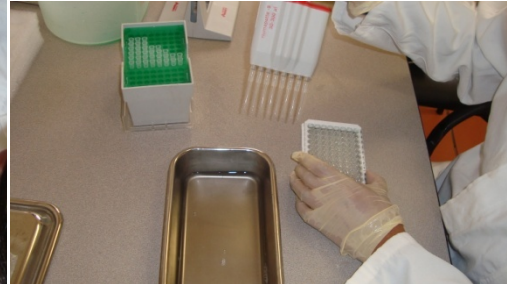
## **ANEXO G**

### **LAVADO DE POSILLOS DE LA PLACA**

**G1**



**G2**



### **PREPARACION DE SOLUCION SUSTRATO**

**G3**



**G4**



### **INCUBACION DURANTE 10 MINUTOS**

**G5**

